

## 唾液中ストレスマーカの ELISA 分析における妥当性の検証

熊澤武志<sup>\*,1)</sup>、中内暁博<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>聖隷クリストファー大学、<sup>2)</sup>昭和大学

【目的】唾液中ストレスマーカは、血液濃度との相関性や疾患との関連性が明らかになりつつあり注目されている。唾液中ストレスマーカの分析には酵素標識免疫測定法（ELISA 法）が主として用いられているが、生体内成分との交差反応が生じることが報告されている。今回の研究では、唾液中ストレスマーカであるコルチゾールの ELISA 法による従来法と超高速液体クロマトグラフィー（UPLC）/タンデム質量分析（MS/MS）法による新しい分析法との比較を行い、ELISA 法による測定結果の妥当性を検討した。

【方法】ヒト唾液は、本学看護学部の学生と教員からボランティアを募り、20 名から提供を受けた。唾液は市販の唾液試料採取用器具を用い採取し、コルチゾール測定まで  $-50^{\circ}\text{C}$  で冷凍保存した。ELISA 法による唾液中コルチゾールの定量は、市販のコルチゾール EIA キット（YK241 矢内原研究所）を用い、添付のプロトコールに従って測定した。また、ELISA 法の吸光度測定には、マイクロプレートリーダー MTP-310Lab（コロナ電気）を用いた。質量分析法では、酢酸エチルを用いた液-液抽出法と UPLC/MS/MS 法を組み合わせたコルチゾール質量分析システムを開発した。この分析システムでは、唾液に内部標準物質（IS）の d4-コルチゾールを添加し、さらに酢酸エチル 1ml を加え混和後、5 分間の遠心分離を施した。得られた上清について、窒素気流下にて蒸発乾固を行い、残渣はアセトニトリル/ギ酸水溶液にて溶解後、その一部を UPLC/MS/MS 分析に供した。なお、UPLC は島津社製、API4000 Q Trap MS/MS 装置はエービー・サイエックス社製を使用し、分析カラムは Cadenza HS-C<sub>18</sub>（インタクト社製）、移動相は 0.1% ギ酸水溶液をベースにしたアセトニトリルによるリニアグラジエント法を用いた。また、質量分析では、正イオン大気圧エレクトロスプレーイオン化法による多重反応モニタリング法を採用した。

【結果・考察】ELISA 法で作成した検量線は、コルチゾールが 0.04~30ng/ml の範囲で相関係数 0.997 であった。また、質量分析システムによる検量線では、コルチゾール 0.025~10ng/ml の範囲で相関係数 0.999 であり、いずれの方法においても良好な結果が得られた。これらの検量線を用いボランティアの唾液中コルチゾールを定量したところ、ELISA 法では 1.08~4.88ng/ml、質量分析システムでは 0.06~1.09ng/ml の範囲の値が得られ、質量分析システムよりも ELISA 法による定量の方が全ての試料において、約 3~26 倍高い値を示した。唾液中ストレスマーカ分析の主流となっている ELISA 法は簡便な方法であるものの、抗体と生体内成分との交差反応あるいは呈色反応が生じやすく、唾液中コルチゾールの場合は高い値が出現しやすいことが推測される。今後、唾液中コルチゾールについて、ELISA 法のプロトコールを再検討し、より特異性の高い測定方法に改良するほか、他社の ELISA キットを使用する等の比較検討も必要であると考えらる。